

## POLIPEPTÍDEOS E PROTEÍNAS COM INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DA ESPUMA DA CERVEJA E MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NO SEU ESTUDO

**Filipe Silva**

Serviço de Bioquímica / REQUIMTE – Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto - Portugal

**Isabel M. P. L. V. O. Ferreira\***

REQUIMTE – Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto - Portugal

**Natércia Teixeira**

IBMC, R. Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto – Portugal, Serviço de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto - Portugal

Recebido em 18/7/05; aceito em 11/11/05; publicado na web em 6/7/06

POLYPEPTIDES AND PROTEINS THAT INFLUENCE BEER FOAM QUALITY AND ANALYTICAL METHODS USED IN THEIR STUDY. A review of polypeptides and proteins that influence, direct or indirectly, beer foam quality, as well as the most relevant analytical methods used in their study, are presented. Protein Z, LTP1 and hordein/glutelin fragments originated from malt have a direct influence on beer foam quality. Other proteins, like malt hordeins and albumins and wheat puroindolines, are, to some degree, also important for beer foam quality. Protein hydrophobicity is pointed out as a key parameter to enhance foam quality. Electrophoretic, chromatographic and immunological analytical methods are currently used to study polypeptides and proteins present in barley, malt, wort, beer, and foam. Best results are obtained when combinations of these methods are applied.

Keywords: beer; polypeptides and proteins; analytical methods.

### INTRODUÇÃO

Uma das primeiras características utilizadas na avaliação de uma cerveja é a qualidade da sua espuma. Pela sua capacidade de influenciar a decisão de compra dos consumidores é um factor muito importante para a indústria cervejeira.

A forma como uma cerveja é dispensada tem grande influência na formação de espuma. A manutenção da espuma formada, no entanto, depende essencialmente da presença de agentes promotores de espuma e da ausência de agentes com efeito nefasto para a mesma<sup>1</sup>.

As proteínas originárias da cevada são o principal constituinte da cerveja capaz de estabilizar a sua espuma<sup>1</sup>. Os seus níveis na cerveja são uma indicação da qualidade da espuma<sup>2</sup> e dependem do tipo de cevada utilizado<sup>3</sup>, da região e do país onde esta foi produzida<sup>4</sup>.

A cerveja tem uma concentração peptídica de aproximadamente 500 mg/L. Enquanto que alguns dos polipeptídeos e proteínas, de massas moleculares compreendidas entre 10 e 40 kDa, não apresentam qualquer função na cerveja (excepto na contribuição nutricional e no “flavour”), outras são responsáveis pela formação de turvação coloidal e ainda outras (cerca de 25%) intervêm no processo de estabilização da espuma<sup>5</sup>.

Os compostos azotados existentes na cerveja, resultantes da degradação das proteínas que ocorre durante as fases de maltagem e produção, são vulgarmente designados por polipeptídeos, restringindo-se o termo proteína para as moléculas que permanecem intactas. Deste modo, muitos investigadores identificaram propriedades dos polipeptídeos e proteínas que têm impacto na formação e na estabilização da espuma da cerveja<sup>6-9</sup>. Estes compostos apresentam diferentes pesos moleculares e hidrofobicidade. É geralmente aceite que quanto maior for a hidrofobicidade, maior é a estabilidade que conferem à espuma<sup>1,10,11</sup>. No entanto, as propriedades destas moléculas que desempenham um papel importante na espuma da cerveja e as interações que elas estabelecem com outros compostos, especialmente iso- $\alpha$ -ácidos derivados do lúpulo, são ainda assuntos controversos<sup>11-14</sup>.

Vários métodos analíticos são utilizados no estudo dos polipeptídeos e das proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja. Os mais utilizados, e que apresentam maiores potencialidades, são os electroforéticos, cromatográficos e imunológicos.

Neste trabalho de revisão serão abordados os polipeptídeos e as proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e seguidamente os métodos analíticos que têm sido utilizados no seu estudo.

### POLIPEPTÍDEOS E PROTEÍNAS COM INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DA ESPUMA DA CERVEJA

Os polipeptídeos e as proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja têm diferentes origens, características e efeitos sobre a espuma, que são resumidos na Tabela 1.

#### Proteína Z

A forma da proteína Z presente na cerveja (também designada por antígeno 1) é originária da proteína Z da cevada<sup>15</sup>, que é uma albumina<sup>16,17</sup> que pode estar presente em duas isoformas: proteína Z4 e proteína Z7<sup>18</sup>. Na cevada e no malte a proteína Z4 é a mais abundante (80%)<sup>18</sup>.

O peso molecular da proteína Z é de cerca de 40 000<sup>5,15,16,19</sup>. Esta é formada por duas proteínas geneticamente diferentes (conhecidas por

\*e-mail: [isabel.ferreira@ff.up.pt](mailto:isabel.ferreira@ff.up.pt)

**Tabela 1.** Resumo das características dos polipeptídeos e das proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja

Composto	Origem	Características	Efeito na espuma
Proteína Z (antigénio 1)	Proteína Z da cevada (albumina)	Glicoproteína Peso molecular: cerca de 40000 Ponto isoelectrico: 5,1–5,4 Termoestável/Resistente à proteólise Elevada hidrofobicidade	Estabilização
LTP1	LTP1 da cevada (albumina)	Glicoproteína Peso molecular: cerca de 9700 Ponto isoelectrico: 9 Termoestável/Resistente à proteólise	Formação
Hordeínas	Cevada	Proteínas de armazenamento Dividem-se em hordeínas A, B, C, D e $\gamma$ Extraídas por misturas álcool/água ou soluções de detergentes. Algumas são termoestáveis	Estabilização moderada (inferior à das albuminas)
Fragmentos de hordeínas e glutelinas	Hordeínas e glutelinas	Diferentes papéis: promotores de espuma – ricos em cisteína <sup>27</sup> ; envolvidos na turvação – polipeptídeos com cerca de 15–32 kDa, ricos em prolina <sup>5</sup> ; com influência positiva na espuma – polipeptídeos com cerca de 8–18 kDa <sup>25</sup>	Alguns fragmentos: estabilização
Albuminas	Cevada	Extraídas por soluções aquosas. Maior capacidade de estabilização da espuma após desnaturação Resistentes à hidrólise por cisteína-proteases	Estabilização moderada (superior à das hordeínas)
Puroindolinas	Trigo	Capacidade de ligação aos lípidos livres em solução	Impedem a sua desestabilização

antigénio 1a e antigénio 1b), imunologicamente relacionadas, separáveis por SDS-PAGE. As duas formas presentes na cerveja derivam de duas albuminas do endosperma da cevada (proteína Z4 e proteína Z7)<sup>19</sup>.

Enquanto que o antigénio 1 tem um ponto isoelectrico de 5,1–5,4<sup>15</sup>, a proteína Z purificada, que lhe deu origem, apresenta um ponto isoelectrico de 5,5–5,8<sup>20</sup>. Esta diferença pode ser devida à glicosilação dos resíduos de lisina no antigénio 1, bem como ao menor conteúdo neste aminoácido (cerca de 16% inferior)<sup>15</sup>. A proteína Z é uma glicoproteína<sup>21</sup> que contém hexoses e pentoses<sup>5</sup>.

A proteína Z mantém-se praticamente inalterada ao longo do processo de produção da cerveja<sup>17,22,23</sup>. É termoestável<sup>19</sup> e resistente à proteólise<sup>24</sup>, devido às suas propriedades inibidoras das proteases<sup>2</sup>.

A proteína Z tem influência na espuma e na turvação da cerveja<sup>15,19</sup>. Está presente na cerveja numa concentração de cerca de 20–170 mg/L<sup>19,23</sup>. Segundo Yokoi e colaboradores<sup>22</sup>, a proteína Z é vantajosa para a estabilidade da espuma da cerveja, devido à sua alta hidrofobicidade, ao seu ponto isoelectrico próximo do pH da cerveja e à sua peculiar actividade viscométrica de superfície.

Vários investigadores propuseram que a proteína Z funcionava como estabilizador de espuma<sup>11,16,22,25</sup>. Contudo, outros investigadores, ao utilizarem cervejas após a remoção da proteína Z<sup>26,27</sup>, ou espuma de cervejas produzidas a partir de maltes pobres em proteína Z<sup>17</sup>, não observaram uma perda significativa da estabilidade das respectivas espumas. Para Leiper e colaboradores<sup>5</sup>, a proteína Z não apresenta qualquer função directa na formação da espuma, podendo, no entanto, desempenhar um papel na estabilização da mesma, depois de esta ter sido formada.

Por outro lado, Evans e colaboradores<sup>2,18</sup> afirmaram que apenas o componente Z4 da proteína Z, a forma dominante desta proteína<sup>17</sup>, está relacionado com a estabilidade da espuma, não havendo, no entanto, qualquer relação entre o componente Z7 e a referida estabilidade.

## LTP1

A “Lipid Transfer Protein 1” (LTP1) da cerveja deriva da LTP1 da cevada, que é uma albumina<sup>24</sup> existente na aleurona dos grãos do referido cereal<sup>5,28</sup>. Esta proteína foi inicialmente designada por “Probable Amylase/Protease Inhibitor” (PAPI), uma vez que se verificou que era homóloga de inibidores da amilase e da protease. Posterior-

mente, ao demonstrar-se que era homóloga das “Lipid Transfer Proteins” (LTPs), passou a ser designada por LTP1<sup>5</sup>.

O peso molecular da LTP1 é geralmente referido como sendo cerca de 9700<sup>5,11,24,27,29,30</sup>. É uma proteína básica<sup>31</sup> constituída por 91 aminoácidos<sup>5,28</sup>, com um ponto isoelectrico de 9<sup>24,28</sup>.

Quanto à sua conformação, a LTP1 da cevada é composta por quatro segmentos em  $\alpha$ -hélice<sup>29</sup>, estabilizados por quatro pontes dissulfureto intramoleculares<sup>29,31</sup> e um longo, e flexível, segmento C-terminal<sup>29</sup>. A forma da LTP1 encontrada na espuma contém oito resíduos de cisteína, que, provavelmente, estarão presentes como cistinas (forma oxidada) na cerveja<sup>11</sup> e quatro resíduos de lisina, que são os potenciais locais de glicosilação<sup>24</sup>.

A LTP1 é glicosilada, provavelmente devido a reacções de Maillard, o que pode explicar a sua resistência a numerosas enzimas, que com ela entram em contacto durante o processamento da cerveja<sup>24</sup>. Enquanto que alguns investigadores sugerem que a LTP1 da cevada inibe algumas endoproteases da cisteína do malte<sup>30</sup>, outros refutam essa hipótese<sup>32</sup>.

A LTP1 demonstra elevada estabilidade em relação ao calor e às proteases<sup>28</sup>. Segundo Lusk e colaboradores<sup>11</sup>, as quatro pontes dissulfureto da LTP1, provavelmente, protegerão esta proteína durante as fases de maltagem e de produção da cerveja. No entanto, Jégou e colaboradores<sup>24</sup> concluíram que a LTP1 sofre modificações químicas marcantes, como redução das pontes dissulfureto, hidrólise e reacções de Maillard. Foi ainda proposto que as modificações sofridas pela LTP1, durante o processamento da cerveja, induziam um maior potencial de formação de espuma<sup>16</sup>.

Mais recentemente, foi confirmada a existência de duas formas de LTP1 na cevada: a LTP1, com peso molecular de 9689, e a LTP1b, com peso molecular de 9983<sup>5,24</sup>. Ambas as formas são modificadas durante o processamento da cerveja, quer por redução das pontes dissulfureto, quer por glicosilação<sup>24</sup>.

Lusk e colaboradores<sup>33</sup> afirmaram que a LTP1 perde a sua estrutura em  $\alpha$ -hélice durante a fase da ebulição do mosto e o seu único resíduo de metionina é oxidado. Estes autores atribuíram a esta forma de LTP1, presente na espuma, a designação de fLTP1.

A LTP1 da cevada pertence a uma extensa família de proteínas das plantas, designadas por “non-specific Lipid Transfer Proteins”

(nsLTP). A função *in vivo* destas proteínas é desconhecida. Contudo, foi sugerido que estão envolvidas em respostas a situações de stress, tais como exposição a agentes patogénicos, ausência de água, temperatura muito elevada ou muito baixa e presença de sais. Foi ainda proposto que funcionam como transportadoras de monómeros para a síntese de cutina<sup>28</sup>.

Existem referências a uma segunda LTP não específica (a LTP2), com 7 kDa<sup>31</sup>, não sendo feitas, no entanto, quaisquer referências a uma possível função na espuma da cerveja.

Enquanto que alguns investigadores sugerem que a LTP1 está envolvida na estabilidade da espuma<sup>5,11</sup>, outros propõem que esta funciona não como estabilizadora, mas sim como promotora de formação de espuma<sup>16</sup>. Por sua vez, Evans e colaboradores<sup>2</sup> demonstraram que a LTP1 não está relacionada com a estabilidade da espuma.

Sørensen e colaboradores<sup>16</sup> demonstraram que uma fracção de cerveja que continha proteína Z, mas não LTP1, não produzia espuma. Contudo, quando esta fracção era adicionada a uma outra, que continha LTP1, a estabilidade da espuma desta era melhorada.

### Hordeínas

As hordeínas são proteínas (prolaminas) de armazenamento, existentes nos grãos de cevada, representando cerca de 40% da quantidade total de proteína encontrada no grão. São geralmente divididas em hordeínas A (< 20 kDa), B (30-45 kDa), C (45-75 kDa) e D (100 kDa)<sup>34,35</sup>. As hordeínas A não são consideradas verdadeiras proteínas de armazenamento. Alguns autores referem ainda a existência de hordeínas  $\gamma$ <sup>35</sup>, não fazendo, no entanto, qualquer alusão ao seu peso molecular. As fracções B e C representam 70-80% e 10-12% do conteúdo total de hordeínas, respectivamente, enquanto que as hordeínas D e  $\gamma$  são fracções minoritárias<sup>35</sup>.

Howard e colaboradores<sup>36</sup> defendem a utilização da quantificação da hordeína D, como método alternativo à quantificação de proteína total, na determinação da qualidade de maltagem de diferentes variedades de cevada.

A extracção das hordeínas da cevada é efectuada utilizando-se misturas de álcool e água ou soluções de detergentes. Estas proteínas apresentam, no estado nativo, uma capacidade de estabilização de espuma de cerveja inferior à apresentada pelas albuminas. Sabe-se que seu tratamento com ácido não afecta a capacidade de estabilização de espuma. Por sua vez, o tratamento térmico aumenta ligeiramente a referida estabilização. A desnaturação das hordeínas leva a um aumento da sua hidrofobicidade, característica importante para a estabilização da espuma<sup>37</sup>.

As cisteíno-proteases hidrolizam a fracção proteica das hordeínas. Uma proteólise limitada destas proteínas, efectuada por estas enzimas, leva a um aumento substancial das suas capacidades estabilizadoras de espuma. No entanto, a acção da proteinase A (proteinase da levedura) resulta na diminuição da referida capacidade estabilizadora<sup>37</sup>.

### Fragmentos de hordeínas e glutelinas

Vários autores sugerem que os polipeptídeos derivados da fragmentação de hordeínas e glutelinas têm influência na espuma da cerveja.

Sørensen e colaboradores<sup>16</sup> propuseram que alguns fragmentos de hordeínas e glutelinas, além de estabilizadores, funcionam como promotores de formação de espuma. Mais recentemente, foram descritos fragmentos de hordeína ricos em cisteína, que são transformados em promotores de espuma durante as fases de brassagem e de ebulição do mosto<sup>27</sup> e outros, ricos em prolina, com cerca de 15 a 32 kDa, que estão envolvidos na formação de turvação na cerveja<sup>5</sup>.

Sheehan e Skerritt<sup>38</sup> referiram ainda que certos polipeptídeos derivados das hordeínas são sensíveis às proteases e são signifi-

cativamente afectados pelas condições da fase da brassagem. Por outro lado, parece existir, ainda, uma acumulação de polipeptídeos, com pesos moleculares entre 8000 e 18000, na espuma da cerveja, no decurso do envelhecimento da mesma, influenciando, positivamente, as propriedades visco-elásticas de filmes proteicos compostos por proteína Z<sup>25</sup>.

### Albuminas

As albuminas da cevada são extraídas em solução aquosa e apresentam, no seu estado nativo, uma capacidade estabilizadora de espuma ligeiramente superior à das hordeínas. Esta diferença torna-se ainda mais pronunciada após desnaturação, especialmente se esta for induzida pelo calor. A desnaturação das albuminas leva, também, a um aumento na hidrofobicidade<sup>37</sup>.

A capacidade superior de estabilização de espuma das albuminas, em relação as hordeínas, reflecte, provavelmente, maior elasticidade de superfície das suas moléculas. Esta capacidade é aumentada na presença de ácidos do amargor derivados do lúpulo. Quando sujeita a proteólise, por tripsina e proteinase A, a fracção proteica das albuminas perde a capacidade de estabilização de espuma, resistindo, no entanto, à digestão efectuada pelas cisteíno-proteases<sup>37</sup>.

Foi observado por vários autores que a estabilidade da espuma não depende somente da capacidade individual das proteínas e dos polipeptídeos para a referida estabilização, mas também das proporções relativas das albuminas e hordeínas<sup>39</sup>.

### Puroindolinas

As puroindolinas existentes na cerveja são proteínas provenientes do trigo (utilizado na produção de alguns tipos de cerveja) e têm a capacidade de se ligarem aos lípidos. A adição destas proteínas exógenas, à cerveja, atenua o efeito negativo dos lípidos sobre a espuma da mesma<sup>40</sup>.

Pensa-se que as puroindolinas do trigo se ligam aos lípidos livres, impedindo assim a destabilização da espuma<sup>40,41</sup>. No entanto, a informação disponível acerca deste grupo de proteínas é reduzida.

## MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NO ESTUDO DOS POLIPEPTÍDEOS E DAS PROTEÍNAS COM INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DA ESPUMA DA CERVEJA

### Métodos electroforéticos

Os métodos electroforéticos têm sido utilizados no estudo dos polipeptídeos e das proteínas que, directa ou indirectamente, estão relacionados com a qualidade da espuma da cerveja.

A electroforese em gel de poli(acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi aplicada por diversos investigadores no estudo das hordeínas de amostras de cevada e de malte, com o objectivo de identificar diferentes cultivares e de determinar a qualidade de maltagem<sup>35,36,42-44</sup>. Neste tipo de amostras, a SDS-PAGE pode ser ainda utilizada para comprovar a inexistência de proteínas específicas em determinadas variedades<sup>17</sup>. Kapp e Bamforth<sup>37</sup> utilizaram este método electroforético para avaliar o impacto de proteólises controladas, escolhidas de forma a simular os efeitos da maltagem e do fabrico da cerveja, em albuminas e hordeínas isoladas da cevada.

Uma vez que a SDS-PAGE separa as proteínas segundo o seu peso molecular, é muitas vezes utilizada na caracterização dos polipeptídeos e proteínas da cerveja<sup>5,19,38,41,45,46</sup> e da espuma<sup>5,11,25,27,29</sup>, assim como dos seus precursores da cevada e do malte<sup>34</sup>. A caracterização destas biomoléculas pode ainda ser complementada com a determinação dos pontos isoelectrónicos, utilizando a focagem isoelectrica (IEF)<sup>21,22,47</sup>.

A electroforese bidimensional (2D-PAGE), por sua vez, é uma metodologia que associa as vantagens da IEF às da SDS-PAGE e que também é utilizada na purificação, identificação e caracterização da proteína Z e da LTP1<sup>19,30</sup>. A 2D-PAGE foi ainda utilizada no estudo proteómico de diferentes cevadas e maltes, para determinar a sua qualidade de maltagem<sup>48</sup>.

A electroforese capilar tem também sido aplicada no estudo das proteínas da cerveja. Esta metodologia foi utilizada por Lusk e colaboradores<sup>33</sup> com o objectivo de averiguar alterações sofridas pela LTP1 e pela proteína Z ao longo do processo de produção de cerveja (Tabela 2).

### Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são frequentemente utilizados separação, isolamento ou purificação de polipectídeos e proteínas da

cevada e da cerveja. Esta separação pode ser obtida por diferentes tipos de cromatografia: de interacções hidrofóbicas (HIC)<sup>17,22,23,41,45,49</sup>, de filtração em gel<sup>15,16,21,24,30,33,46,47,50</sup>, de troca iónica<sup>11,15,16,22,24,29,30</sup> e de afinidade, utilizando diferentes ligandos, como são exemplos a concanavalina A<sup>47,51</sup> ou os anticorpos específicos para determinadas proteínas<sup>26,27</sup>.

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é uma evolução dos métodos cromatográficos mais tradicionais e tem sido aplicada com benefícios inquestionáveis. O método de HPLC em fase reversa (RP-HPLC) foi já utilizado no estudo da composição em hordeínas de diferentes cultivares de cevada<sup>34</sup> e na separação de proteínas da espuma da cerveja<sup>11</sup>. Alguns investigadores aplicaram esta metodologia tanto na purificação da forma da LTP1 da cevada<sup>24,30</sup> como da forma existente na cerveja<sup>24</sup>. A HPLC de filtração em gel, por sua vez, foi utilizada tanto na purificação da proteína Z<sup>26,33</sup> como na purificação da LTP1 da cerveja<sup>30</sup> (Tabela 3).

**Tabela 2.** Exemplos da aplicação dos métodos electroforéticos no estudo dos polipectídeos e das proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja

Método	Aplicação	Ref.
Electroforese com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	Identificação de cultivares e determinação de qualidade de maltagem de cevadas	35,36,42
	Caracterização de polipectídeos e proteínas (Determinação de pesos moleculares)	5,11,19,25,27,29,34,37,38,41,45,46
	Comprovação da inexistência de uma proteína específica numa variedade de malte	17
Focagem Isoeléctrica	Caracterização de polipectídeos e proteínas (Determinação de pontos isoelectricos)	21,22,47
Electroforese Bidimensional (2D-Page)	Determinação de qualidade de maltagem de cevadas e maltes	48
	Purificação, identificação e caracterização de proteínas	19,30
Electroforese capilar	Quantificação estimativa de polipectídeos específicos (Proteína Z e fLTP)	33

fLTP – “foam Lipid Transfer Protein”

**Tabela 3.** Exemplos da aplicação dos métodos cromatográficos no estudo dos polipectídeos e das proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja

Método	Aplicação	Ref.
Cromatografia de interacções hidrofóbicas	Separação de polipectídeos e de proteínas	17,22,23,41,45,49
Cromatografia por filtração em gel	Separação de polipectídeos e de proteínas	15,16,24,30,33,46,50
	Estimação do peso molecular de determinadas fracções polipectídicas	21,47
Cromatografia de troca iónica	Separação de polipectídeos e de proteínas	11,22
	Purificação de polipectídeos específicos	15,16,29,30
Cromatografia de afinidade	Separação de polipectídeos e de proteínas	27,47,51
	Remoção de polipectídeos específicos	26
HPLC	Separação de polipectídeos e de proteínas	11,34
	Purificação de polipectídeos específicos (Proteína Z e LTP1)	24,26,30,33

**Quadro 4.** Exemplos da aplicação dos métodos imunológicos no estudo dos polipeptídeos e das proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja

Método	Aplicação	Ref.
ELISA	Quantificação de polipeptídeos e proteínas	2,4,17,18,23,27,29,38,52,53
	Avaliação da eficácia de um método de remoção de um polipeptídeo específico	26
	Averiguação da eficácia de outros testes imunoquímicos	54
	Caracterização de anticorpos quanto à sua ligação a determinadas fracções proteicas	45
Western Blot	Detecção de polipeptídeos e proteínas	16,17,19,27,29,38,55,56
	Averiguação da eficácia de anticorpos monoclonais específicos para uma fracção polipeptídica da cerveja	45
Imunoelectroforeses	Detecção de polipeptídeos e proteínas	16,47
Rocket Imunoelectroforese	Quantificação de polipeptídeos e de proteínas	15
	Avaliação da eficácia de um método de remoção de um polipeptídeo específico	26

## Métodos imunológicos

O método ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) é talvez o método imunológico mais utilizado no estudo dos polipeptídeos e das proteínas relacionados com a qualidade da espuma da cerveja. Este método tem sido utilizado na quantificação do nível de proteínas promotoras de espuma (proteína Z4, proteína Z7 e/ou LTP1)<sup>2,4,17,18,26,29,52,53</sup>, de proteínas envolvidas no processo de turvação da cerveja<sup>4,52</sup> e de polipeptídeos específicos, como é o caso de um referido por Vaag e colaboradores<sup>27</sup>, com um peso molecular de 17000. O método ELISA foi também utilizado para testar a capacidade de outros testes imunoquímicos aplicados no estudo destes polipeptídeos<sup>54</sup> e para caracterizar anticorpos quanto à sua ligação a fracções proteicas específicas<sup>45</sup>. Onishi e colaboradores<sup>53</sup> referiram que o alginato de propilenoglicol (aditivo utilizado para melhorar a estabilidade da espuma), que é por vezes utilizado durante a produção da cerveja, pode interferir na ligação de anticorpos monoclonais a determinadas proteínas.

Outro método imunológico bastante utilizado é o “western blot”, que tem sido aplicado no estudo de proteínas da espuma da cerveja<sup>55,56</sup>, da proteína Z da cerveja e dos seus precursores na cevada<sup>17,19</sup> e ainda da LTP1<sup>16,29</sup>. Mills e colaboradores<sup>45</sup> utilizaram este método para testarem a eficácia de um painel de 15 anticorpos monoclonais específicos para uma fracção proteica da cerveja.

Por sua vez, a imunoelectroforese, que é um método que combina as vantagens das técnicas imunológicas com as das electroforéticas, foi utilizada por Asano e Hashimoto<sup>47</sup> para clarificar a origem de proteínas da cerveja relacionadas com a sua espuma. Hejgaard e Kaersgaard<sup>15</sup>, por outro lado, optaram pela utilização da rocket imunoelectroforese, que é uma das variantes dos métodos imunoelectroforéticos, na quantificação da proteína Z (antigénio 1) presente na cerveja e Hollemans e Tonies<sup>26</sup> aplicaram-na, ainda, na avaliação da eficácia de um método de remoção da mesma proteína Z da espuma da cerveja. A imunoelectroforese cruzada, outra das variantes dos métodos imunoelectroforéticos, foi utilizada por Sørensen e colaboradores<sup>16</sup>, na detecção da proteína Z (Tabela 4).

## CONCLUSÕES

A proteína Z, a LTP1 e alguns fragmentos de hordeínas e glutelinas são os compostos mais estudados e considerados mais importantes

para a qualidade da espuma da cerveja. Deste modo, justifica-se a maior quantidade de informação disponível relativa a estes compostos, em comparação com a obtida acerca dos outros grupos de proteínas e polipeptídeos da cerveja. No entanto, algumas proteínas, como as hordeínas e as albuminas do malte e as puroindolinas do trigo, são também referidas como tendo alguma influência na referida espuma.

Na opinião de alguns autores, quanto maior for a hidrofobicidade da proteína, maior a sua actividade promotora de espuma<sup>1,10,11</sup>, o que está concordante com estudos realizados pelo nosso grupo de investigação<sup>13</sup>, nos quais se verificou que níveis elevados de polipeptídeos hidrofóbicos têm influência positiva na estabilidade da espuma. No entanto, verificou-se também que a presença de níveis mínimos de iso- $\alpha$ -ácidos é imprescindível para obter uma espuma estável.

Os métodos electroforéticos, cromatográficos e imunológicos têm sido utilizados no estudo dos polipeptídeos e das proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja, em amostras de cevada, malte, mosto, cerveja e espuma. A escolha de qualquer um dos métodos apresentados depende sempre do objectivo do estudo, utilizando-se geralmente uma combinação de vários métodos.

## REFERÊNCIAS

- Bamforth, C. W.; *J. Inst. Brew.* **91**, 370.
- Evans, D. E.; Sheehan, M. C.; Stewart, D. C.; *J. Inst. Brew.* **1999**, *105*, 171.
- Dale, C. J.; Young, T. W.; Brewer, S.; *J. Inst. Brew.* **1989**, *95*, 89.
- Ishibashi, Y.; Kakui, T.; Terano, Y.; Hon-No, E.; Kogin, A.; Nakatani, K.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1997**, *55*, 20.
- Leiper, K. A.; Stewart, G. G.; McKeown, I. P.; *J. Inst. Brew.* **2003**, *109*, 73.
- Maeda, K.; Yokoi, S.; Kamada, K.; Kamimura, M.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1991**, *49*, 14.
- Mohan, S. B.; Perry, L.; Malhotra, J. M.; Lyddiatt, A.; *J. Inst. Brew.* **1993**, *99*, 231.
- Yokoi, S.; Yamashita, K.; Kunitake, N.; Koshino, S.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1994**, *52*, 123.
- Onishi, A.; Proudlove, M. O.; *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 233.
- Slack, P. T.; Bamforth, C. W.; *J. Inst. Brew.* **1983**, *89*, 397.
- Lusk, L. T.; Goldstein, H.; Ryder, D.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1995**, *53*, 93.
- Kordialik-Bogacka, E.; Ambroziak, W.; *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1960.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Jorge, K.; Nogueira, L.; Silva, F.; Trugo, L.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4976.
- Keukeleire, D.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 108.
- Hejgaard, J.; Kaersgaard, P.; *J. Inst. Brew.* **1983**, *89*, 402.



16. Sørensen, S. B.; Bech, L. M.; Muldbjerg, M.; Beenfeldt, T.; Breddam, K.; *MBAA Tech. Q.* **1993**, 30, 136.
17. Gibson, C. E.; Evans, D. E.; Proudlove, M. O.; *Ferment.* **1995**, 9, 81.
18. Evans, D. E.; Nischwitz, R.; Stewart, D. C.; Cole, N.; MacLeod, L. C.; *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality* **1999**, 27, 114.
19. Curioni, A.; Pressi, G.; Furegon, L.; Peruffo, A. D. B.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2620.
20. Hejgaard, J.; *Physiol. Plant.* **1982**, 54, 174.
21. Lusk, L. T.; Cronan, C. L.; Chicoye, E.; Goldstein, H.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1987**, 45, 91.
22. Yokoi, S.; Maeda, K.; Xiao, R.; Kamada, K.; Kamimura, M.; *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1989**, 593.
23. Hughes, P. S.; Mills, C.; Kauffman, J.; Brierley, E.; Dickie, K.; Proudlove, M.; Onishi, A.; Wilde, P.; *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality* **1999**, 27, 129.
24. Jégou, S.; Douliez, J.-P.; Mollé, D.; Boivin, P.; Marion, D.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5023.
25. Douma, A. C.; Bos, M. A.; Mocking-Bode, H. C. M.; Angelino, S. A. G. F.; *Proc. 26<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1997**, 671.
26. Hollemans, M.; Tonies, A. R. J. M.; *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1989**, 561.
27. Vaag, P.; Bech, L. M.; Cameron-Mills, V.; Svendsen, I.; *Proc. 27<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1999**, 157.
28. Lindorff-Larsen, K.; Winter, J. R.; *FEBS Lett.* **2001**, 488, 145.
29. Bech, L. M.; Vaag, P.; Heinemann, B.; Breddam, K.; *Proc. 25<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1995**, 561.
30. Jones, B. L.; Marinac, L. A.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1997**, 55, 58.
31. Douliez, J.-P.; Michon, T.; Elmorjani, K.; Marion, D.; *J. Cereal Sci.* **2000**, 32, 1.
32. Davy, A.; Svendsen, I.; Bech, L.; Simpson, D. J.; Cameron-Mills, V.; *J. Cereal Sci.* **1999**, 30, 237.
33. Lusk, L. T.; Ting, P.; Goldstein, H.; Ryder, D.; Navarro, A.; *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality* **1999**, 27, 166.
34. Schmitt, N.; Gille, P.; Gaucher, J.; Montembault, A.; *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1989**, 187.
35. Molina-Cano, J. L.; Polo, J. P.; Romera, E.; Araus, J. L.; Zarco, J.; Swanson, J. S.; *J. Cereal Sci.* **2001**, 34, 285.
36. Howard, K. A.; Gayler, K. R.; Eagles, H. A.; Halloran, G. M.; *J. Cereal Sci.* **1996**, 24, 47.
37. Kapp, G. R.; Bamforth, C. W.; *J. Sci. Food Agric.* **2002**, 82, 1276.
38. Sheehan, M. C.; Skerrett, J. H.; *J. Inst. Brew.* **1997**, 103, 297.
39. Bamforth, C. W.; Milani, C.; *J. Sci. Food Agric.* **2004**, 84, 1001.
40. Clark, D. C.; Wilde, P. J.; Marion, D.; *J. Inst. Brew.* **1994**, 100, 23.
41. Cooper, D. J.; Husband, F. A.; Mills, E. N. C.; Wilde, P. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7645.
42. Villiers, O. T.; Laubscher, E. W.; *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1989**, 203.
43. Peltonen, J.; Rita, H.; Aikasalo, R.; Home, S.; *Hereditas* **1994**, 120, 231.
44. Echert-Almeida, C.; Cavalli-Molina, S.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2001**, 36, 211.
45. Mills, E. N. C.; Kauffman, J. A.; Morgan, M. R. A.; Field, J. M.; Hejgaard, J.; Proudlove, M. O.; Onishi, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4475.
46. Osman, A. M.; Coverdale, S. M.; Onley-Watson, K.; Bell, D.; Healy, P.; *J. Inst. Brew.* **2003**, 109, 41.
47. Asano, K.; Hashimoto, N.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1980**, 38, 129.
48. Østergaard, O.; Melchior, S.; Roepstorff, P.; Svensson, B.; *Proteomics* **2002**, 2, 733.
49. Slack, P. T.; Bamforth, C. W.; *J. Inst. Brew.* **1983**, 89, 397.
50. Dale, C. J.; Young, T. W.; *J. Inst. Brew.* **1987**, 93, 465.
51. Kaersgaard, P.; Hejgaard, J.; *J. Inst. Brew.* **1979**, 85, 103.
52. Ishibashi, Y.; Terano, Y.; Fukui, N.; Honbou, N.; Kakui, T.; Kawasaki, S.; Nakatani, K.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1996**, 54, 177.
53. Onishi, A.; Proudlove, M. O.; Dickie, K.; Mills, E. N. C.; Kauffman, J. A.; Morgan, M. R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3044.
54. Evans, D. E.; Sheehan, M.; Robinson, L.; Hill, A.; Tolhurst, R.; Gale, K.; Barr, A.; *Proc. 10<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium* **2001**.
55. Mohan, S. B.; Smith, L.; Kemp, W.; Lyddiatt, A.; *J. Inst. Brew.* **1992**, 98, 187.
56. Mohan, S. B.; O'Shaughnessy, C.; Shuttleworth, G.; Lyddiatt, A.; *Proc. 24<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.* **1993**, 341.